

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. August 2005 (18.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/074350 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/050479

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Februar 2005 (04.02.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102004005885.7 5. Februar 2004 (05.02.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS- UNI-
VERSITÄT BONN [DE/DE]; Regina-Pacis-Weg 3, 53113
Bonn (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MARX, Andreas
[DE/DE]; Maximilianstr. 34, 53111 Bonn (DE). SUM-
MERER, Daniel [DE/DE]; Luisenstr. 129, 53129
Bonn (DE). RUDINGER, Nicolaus, Zackes [DE/DE];
Beethovenstr. 1, 53115 Bonn (DE).

(74) Anwalt: HELBING, Jörg; Von Kreisler Selting Werner,
Postfach 102241, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Inter-
nationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MUTATED DNA POLYMERASES WITH INCREASED MISPAIRING DISCRIMINATION

(54) Bezeichnung: MUTIERTE DNA-POLYMERASEN MIT ERHÖHTER FEHLPAARUNGS-DISKRIMINIERUNG

(57) Abstract: The invention relates to DNA polymerases with a special mutation, exhibiting increased mispairing discrimination. The invention also relates to the production and use thereof. The thermostable DNA polymerases with said mutation are particularly suitable for diagnostic and molecular biological methods, e.g. allele-specific PCR.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Polymerasen mit einer speziellen Mutation, die eine erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweisen, deren Herstellung und Verwendung. Die thermostabilen DNA-Polymerasen mit dieser Mutation sind besonders für diagnostische und molekularbiologische Verfahren, z.B. allelspezifische PCR geeignet.



WO 2005/074350 A2

Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter Fehlpaarungs-Diskriminierung

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Polymerasen mit einer speziellen Mutation, die eine erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweisen, deren Herstellung und Verwendung. Die thermostabilen DNA-Polymerasen mit dieser Mutation sind besonders für diagnostische und molekularbiologische Verfahren, z.B. allelspezifische PCR geeignet.

Hintergrund der Erfindung

Seit der Vorstellung der ersten menschlichen Genomsequenzen konzentriert sich die Forschung auf die Entdeckung genetischer Unterschiede zwischen den Individuen wie z.B. Einzelbasenmutationen ("single nucleotide polymorphisms" SNP's). Dies ist von Interesse, da zunehmend ersichtlich wird, dass Einzelbasenvariationen im Genom mit unterschiedlicher Arzneimittelverträglichkeit oder Prädisposition für verschiedenste Krankheiten verknüpft sind. In Zukunft könnte die Kenntnis medizinisch relevanter Nukleotidvariationen es ermöglichen, Therapien auf die individuelle genetische Ausstattung anzupassen und die Behandlung mit Medikamenten, die ineffektiv sind oder sogar zu Nebenwirkungen führen, könnte verhindert werden (Shi, Expert Rev. Mol. Diagn. 1, 363-365 (2001)). Es ist offensichtlich, dass Entwicklungen, die eine zeit- und kosteneffiziente Identifizierung von Nukleotidvariationen ermöglichen, zu weiteren Fortschritten in der Pharmakogenetik führen.

SNPs machen den größten Teil der genetischen Variationen im menschlichen Genom aus, und sind die Ursache für über 90% der Unterschiede zwischen Individuen (Kwok, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet 2, 235-258 (2001); Kwok und Chen, Curr. Issues Mol. Biol. 5, 43-60 (2003); Twyman and Primrose, Pharmacogenomics 4, 67-79 (2003)). Zum Nachweis solcher genetischer Variationen und anderer Nukleinsäure-Varianten wie Mutationen können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Beispielsweise kann die Identifikation der Variante einer Target-Nukleinsäure durch Hybridisation der zu analysierenden Nukleinsäure-Probe mit einer Sequenzvarianten-spezifischen Hybridisationssonde unter geeigneten Hybridisationsbedingungen erfolgen (Guo et al., Nat. Biotechnol. 15, 331-335 (1997)).

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass derartige Hybridisierungsmethoden insbesondere den klinischen Anforderungen hinsichtlich der erforderlichen Sensitivität derartiger Assays nicht genügen. Deshalb hat zum Nachweis von Mutationen, Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) sowie anderen allelischen Sequenzvarianten insbesondere auch die PCR (Saiki et al., Science 239, 487-490 (1988)) breiten Eingang in molekularbiologische und diagnostische Untersuchungsverfahren gefunden, wobei eine im Hinblick auf die Existenz einer Variante zu untersuchende Target-Nukleinsäure durch eine Polymerase-Kettenreaktion vor der Hybridisierung amplifiziert wird. Als Hybridisationssonden für derartige Assays werden in der Regel einzelsträngige Oligonukleotide verwendet. Eine abgewandelte Ausführungsform dieser Assays sind solche, die fluoreszierende Hybridisationssonden einsetzen (Livak, Genet Anal. 14, 143-149 (1999)). Generell wird angestrebt, Verfahren zur Bestimmung SNPs und andern Sequenzvariationen zu automatisieren (Gut, Hum. Mutat. 17, 475-492 (2001)).

Eine bereits im Stand der Technik bekannte Alternative zur Sequenzvariantenspezifischen Hybridisierung bietet die sogenannte Allel-spezifische Amplifikation (Newton et al., Nucleic. Acids Res. 17, 2503-2516 (1989); Germer et al., genome res. 10, 258-266 (2000); Gibbs et al., Nucleic. Acids Res. 17, 2437-2448 (1989); Wu et al., PNAS 86, 2757-2769 (1989); Ishikawa et al., Hum. Immunol. 42, 315-318 (1995)). Bei diesem Nachweisverfahren werden bereits während der Amplifikation Varianten-spezifische Amplifikationsprimer eingesetzt, die in der Regel am 3'-terminalen Ende des Primers einen sog. diskriminierenden terminalen Nukleotidrest besitzen, welcher lediglich komplementär zu nur einer speziellen Variante der nachzuweisenden Target-Nukleinsäure ist. Bei dieser Methode werden Nukleotidvariationen durch die An- oder Abwesenheit von DNA-Produkt nach der PCR-Amplifikation bestimmt. Das Prinzip der Allel-spezifischen Amplifikation basiert auf der Ausbildung von kanonischen oder nicht kanonischen Primer-Template-Komplexen am Ende von allel-spezifischen Primersonden. An einem korrekt gepaarten 3'-Primerende kann die Amplifikation durch eine DNA-Polymerase stattfinden, bei einem fehlgepaarten Primerende hingegen sollte die Verlängerung gehemmt sein.

US 5,595,890 beschreibt beispielsweise derartige Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation sowie deren Anwendung zum Nachweis von klinisch relevanten Punktmutationen, beispielsweise im k-ras-Onkogen. US 5,521,301 beschreibt ebenfalls Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation zur Genotypisierung des

AB0-Blutgruppensystems. US 5,639,611 offenbart dagegen die Verwendung Allel-spezifischer Amplifikation im Zusammenhang mit dem Nachweis der für Sichelzell-Anämie verantwortlichen Punktmutation.

Die Allel-spezifische Amplifikation ist jedoch insofern problematisch, das sie sich durch eine nur geringe Selektivität aufzeichnet, wodurch weitere, aufwendige und damit zeit- und kostenintensive Optimierungsschritte bedingt werden.

Derartige Verfahren zum Nachweis von Sequenzvarianten, Polymorphismen und vor allem Punktmutationen erfordern insbesondere dann eine Allel-spezifische Amplifikation, wenn sich die nachzuweisende Sequenzvariante im Unterschuss verglichen mit einer im Überschuss vorhandenen Variante desselben Nukleinsäureabschnitts (bzw. desselben Gens) befindet.

Eine derartige Situation ist beispielsweise dann gegeben, wenn mit Hilfe von Allel-spezifischer Amplifikation disseminierte Tumorzellen in Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma nachgewiesen werden sollen (US 5,496,699). Zu diesem Zweck wird zunächst DNA aus Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma isoliert, welche sich aus einem Unterschuss DNA aus disseminierten Tumorzellen sowie einem Überschuss an DNA aus nicht proliferierenden Zellen zusammensetzt. Die für die tumorale DNA signifikanten Mutationen im k-Ras Gen müssen somit aufgrund von wenigen Kopien tumoraler DNA in Gegenwart eines Überschusses an Wildtyp DNA nachgewiesen werden.

Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation haben den Nachteil, dass trotz der Verwendung von 3' diskriminierenden Nukleotidresten eine Primerextension in Gegenwart einer geeigneten DNA Polymerase in geringerem Umfang auch dann erfolgt, wenn die Target-Nukleinsäure nicht exakt der nachzuweisenden Sequenzvariante entspricht, d. h., sich von dieser zumindest in dem zum diskriminierenden Nukleotidrest komplementären Nukleotid unterscheidet. Dies führt insbesondere dann zu falsch-positiven Ergebnissen, wenn eine bestimmte Sequenzvariante in einem Überschuss-Background von Nukleinsäuren enthaltend eine andere Sequenzvariante nachgewiesen werden soll. Dies ist wie oben erwähnt beispielsweise bei der Detektion von bestimmten k-Ras-Allelen als Indikator für disseminierte Tumorzellen der Fall. Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren besteht darin, daß in jedem Falle ein 3' terminal diskriminierender Oligonukleotidrest verwendet werden muß. Maßgeblich für die Nachteile dieser auf PCR basierenden Verfahren ist die Unfähigkeit der in diesen Verfahren eingesetzten Polymerasen, ausreichend zwischen Ba-

senfehlpaarungen zu diskriminieren. Bislang war es daher nicht möglich, direkt durch PCR eine eindeutige Aussage über die An- bzw. Abwesenheit einer Mutation zu machen. Es bedarf bislang immer weiterer zeit- und kostenintensive Aufreinigungs- und Analyseverfahren für eine eindeutige Diagnose solcher Mutationen. Daher werden Neuerungen, die eine Erhöhung der Selektivität der Allel-spezifischen PCR Amplifikation ermöglichen, einen signifikanten Einfluss auf Verlässlichkeit und Robustheit der direkten SNP-Analyse durch die PCR haben.

Andererseits werden bereits eine Reihe von Modifikationen in der Proteinsequenz der DNA-Polymerasen I beschrieben. So erwähnt das US-Patent 6,329,178 DNA-Polymerasemutanten mit geänderter katalytischer Aktivität, bei denen Mutationen in dem A-Motiv (der hochkonservierten Sequenz DYSQIELR) erfolgt waren. Darüber hinaus beschreibt Minnick, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 3067 – 3075 (1999) eine Vielzahl von *E.-coli*-DNA-Polymerase-I-(Klenow-Fragment)-Mutanten, bei denen Alaninaustausche vorgenommen wurden. Ein Teil der beschriebenen Mutanten zeigt eine höhere Polymerase-Genauigkeit, bezogen auf den Wildtyp. Eine der erwähnten Mutanten ist H881A; besondere Eigenschaften dieser Mutanten in Bezug auf die anderen beschriebenen Mutanten werden nicht aufgeführt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, Sequenzvarianten mit erhöhter Spezifität bereitzustellen, mit deren Hilfe ein Sequenzvarianten-spezifisches Nachweisverfahren ermöglicht wird.

Kurzbeschreibung der Erfindung

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass spezielle Mutanten von DNA-Polymerasen der Familie A, nämlich solche, in denen das konservierte C-Motiv und insbesondere dessen QHV-Aminosäuresequenz modifiziert wurde, eine erhöhte Fehlerpaarungs-Diskriminierung aufweisen und in Nachweisverfahren für Sequenzvarianten einsetzbar sind. Die thermostabilen Varianten hiervon sind zur allelspezifischen PCR geeignet. Die vorliegende Erfindung betrifft im Einzelnen

(1) eine DNA-Polymerase der Familie A, die eine modifizierte Motiv-C-Sequenz und eine, im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyppolymerase, erhöhte Fehlerpaarungs-Diskriminierung aufweist, oder ein Klenow-Fragment derselben;

(2) eine bevorzugte DNA-Polymerase von Ausführungsform (1), wobei in der Motiv-C-Sequenz QVH in Position 879-881, bezogen auf das in SEQ ID NO:2

- gezeigte Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase, wenigstens der Aminosäurerest Q879 durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt ist;
- (3) eine DNA-Sequenz, die die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß Ausführungsform (1) oder (2) codiert;
- (4) einen Vektor, der die DNA-Sequenz gemäß Ausführungsform (3) enthält;
- (5) eine Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Ausführungsform (4) transformiert ist und/oder eine DNA gemäß Ausführungsform (3) aufweist;
- (6) ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß der Ausführungsform (1) oder (2), umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß Ausführungsform (5) und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand;
- (7) die Verwendung der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments gemäß Ausführungsform (1) oder (2) in diagnostischen und molekularbiologischen Verfahren, einschließlich allel-spezifischer PCR, DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung usw.;
- (8) ein Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe unter Verwendung einer DNA-Polymerase gemäß der Ausführungsform (1) oder (2); und
- (9) einen Kit zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe gemäß des Verfahrens nach Ausführungsform (8) enthaltend wenigstens eine DNA-Polymerase gemäß Ausführungsform (1) oder (2).

Kurzbeschreibung der Figuren

Fig. 1: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (SEQ ID NO:2) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex (Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TX-3', X= A, G, C oder T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG CYA GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y= A, G, C oder T (SEQ ID NO:12), 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,05% Triton® X-100).

Fig. 2: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (bezogen auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment aus *E. coli*) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex [**a:** Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:14); Matrizen: 5'-GGT CTA GCT ACA G_XG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3', X = A oder T (SEQ ID NO:15); **b:** Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15); Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA C_XT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3', X = A oder G (SEQ ID NO:16)], 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,05% Triton® X-100).

Fig. 3: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen im QVH-Motiv in Taq DNA-Polymerase I auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex [**a:** Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC T_X-3', X = T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG C_YA GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y = A oder G (SEQ ID NO:12); **b:** Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:13); Matrize: 5'-GGT CTA GCT ACA G_XG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3', X = A oder T (SEQ ID NO:14); **c:** Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15); Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA C_XT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3', X = A oder G (SEQ ID NO:16)], 1mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 0,6 ng DNA-Polymerase. Inkubation bei 37 °C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9,2 bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 % Tween® 20).

Fig. 4: Real-time PCR Experimente mit Taq (wt) (SEQ ID NO:4) und LVL-Mutante (SEQ ID NO:4 mit LVL in Positionen 782 – 784). Die Experimente wurden mittels einem *iCycler* (BIORAD) System durchgeführt. Typische Reaktion in 20 µl enthielt: 40 pM der betreffenden Matrize in Taq DNA-Polymerase Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9,2 bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 2,5 mM MgCl₂, 0,1% Tween® 20, 0,3 mM dNTPs) 0,5 µM der beiden Primer und 95 ng Taq DNA-Polymerase und eine 1/50.000 von SybrGreen I 10.000x-Lösung in DMSO (Molecular

Probes). Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Zyklen bei 95°C für 30 s, 55°C für 35 s und 72°C für 40 s. Reaktionen 1w, 2w, 3w und 4w wurden mit dem Wildtyp-Enzym, 1m, 2m, 3m und 4m mit der LVL-Mutante durchgeführt. DNA-Sequenzen:

a. Primersonde: 5'-d(GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T) (SEQ ID NO:19); Reverse Primer: 5'-d(AGA GGA AAG ATG AAG TAC TAT G) (SEQ ID NO:20); Matrize: 5'-d(CAA CTG TTC AAA CTG ATG GGA CCC ACT CCA TCG AGA TTT CXC TGT AGC TAG ACC AAA ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TTC ATG AAG AAA TAT ATC TGA GGT GTA GTA AGT AAA GGA AAA CAG TAG ATC TCA TTT TCC TAT CAG AGC AAG CAT TAT GAA GAG TTT AGG TAA GAG ATC TAA TTT CTA TAA TTC TGT AAT ATA ATA TTC TTT AAA ACA TAG TAC TTC ATC TTT CCT CT), X= A (wildtyp)(1) oder T (Mutante)(2) (SEQ ID NO:21).

b. Primersonde: 5'-d(GTT TTA GAT GT TAA ATC ACA CTT AT) (SEQ ID NO:22); Reverse Primer: 5'-d(AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AG) (SEQ ID NO:23); Matrize: 5'-d(AAA ATG TGA GAA GGG ACC TCA TAA AAT ATG TCA TAT GGA AAT GAG CAG ATA ATA AAG ATT ATA GCT TTT CTT TGT CAA AAG GAG ACT CAA TAT CTT TAC TCT TTC ATC AGG ACA TTG TGA CAA ATG TTT CCC CCA GAA TCA TCC GGG GAA CCA CCT CTG GCC CCA TGT ATG GCC CTG GAC AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AGC TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT ATT GGT GTC AAA GTG TCA CTG AAC TAA AGG CTG ACT TTC CAG ACA ACX TAA GTG TGA TTT AAC ATC TAA AAC), X= A (wildtyp)(3) oder G (Mutante)(4) (SEQ ID NO:24).

Fig. 5: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur vergleichenden Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (SEQ ID NO:2) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Verglichen wurde die erfindungsgemäße Mutante LVL mit der literaturbekannten Mutante QVA (Minnick, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 3067 – 3075 (1999)). Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex (Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TX-3', X= A, G, C oder T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG CYA GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y= A, G, C oder T (SEQ ID NO:12), 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,05% Triton® X-100).

Sequenzprotokoll - Freier Text

SEQ ID NO:	Beschreibung - freier Text
1	E. coli Wildtyp Klenow Fragment der DNA Polymerase 1
2	E.coli Klenow Fragment der DNA Polymerase 1
3	Wildtyp Taq Polymerase
4	Wildtyp Taq Polymerase
5	Primer
6	Downstream-Primer
7	Antisense-Primer
8	Primer FVL20TH
9	Matrize TFVL90A
10	Matrize TFVL90G
11	Primer zur Detektion des SNPs in der humanen genomischen Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz
12	Matrize der humanen genomischen Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz; n=g, Wildtypmatrize; n=a, mutante Matrize
13	Primer zur Detektion der humanen somatische BRAF-T1796A-Mutation
14	Wildtyp Matrize des BRAF Gens; w= t, Wildtypmatrize; w = a, mutante Matrize
15	Primer zur Detektion der humanen Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A
16	Matrize des humanen DPyD; r = g, Wildtypmatrize; r = a, mutante Matrize
17	Primer zur Detektion der humanen sauren Ceramidase Mutation A107G
18	Matrize der humanen sauren Ceramidase; r = a, Wildtypmatrize; r = g, mutante Matrize
19	Primersonde BrafT
20	umgekehrter Primer für BRAF
21	Zielmatrize BrafX; w = a, Braf A (Wildtyp); w = t, BrafT (Mutante)
22	Primersonde DpyDT
23	umgekehrter Primer für DpyDT
24	Zielmatrize DpyDX; r = a, DpyDA (Wildtyp); r = t, DpyDT (Mutante)
25	pTTQ18::Taq
26	pQE30
27	Matrizenausschnitt (SEQ ID NO:14); w = t, Wildtyp; w = a, mutante Matrize
28	Matrizenausschnitt (SEQ ID NO:16); r = g, Wildtyp; r = a, Mutante
29	Matrizenausschnitt (SEQ ID NO:12); r = t, Wildtyp; r= a, Mutante

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mutierte DNA-Polymerasen der Familie A mit erhöhter Fehlpaarungs-Diskriminierungsfähigkeit, oder Klenow-Fragmente derselben. Die erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierungsfähigkeit - worunter eine hohe Selektivität gemäß der Watson-Crick-Regeln beim Einbau von komplementären Basen, wie auch schon der Anlagerung eines Primers an die Matrize zu verstehen ist, d. h. ein größeres Verlängerungsselektivitätsverhältnis ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$) als die entsprechende Ausgangspolymerase (Wildtyp) aufweist (z. B. bestimmt in dem Fluoreszenz-Testsystem gemäß Beispiel 2) - kann durch Mutation einer bestimmten Aminosäuresequenz in natürlichen Enzymen erreicht werden. Die dadurch bedingten Eigenschaften der DNA-Polymerasen übertreffen die der "State-of-the-art" Wildtyppolymerasen, wie sie derzeit kommerziell vertrieben werden. Die Erhöhung der Selektivität der Aktivität von DNA-Polymerasen ermöglicht verlässlichere Systeme zum Nachweis von Mutationen oder Polymorphismen, die direkte Diagnose durch allel-spezifische PCR ohne nachgeschaltete zeit- und kostenintensive Aufreinigungs- und Analyseverfahren und hohe Nachhaltigkeit, da keine chemischen modifizierten Primer verwendet werden müssen.

Nachfolgend Definitionen sind auf die gesamte Anmeldung anzuwenden, sind aber nicht limitierend zu verstehen. "DNA-Polymerasen der Familie A" (auch Polymerasen I genannt) sind solche DNA-polymerisierenden Enzyme, die das A-Motiv mit der Sequenz DYSQIELR in ihrem aktiven Zentrum aufweisen. Es zählen dazu auch die hier beschriebenen Enzyme, die Mutationen im C-Motiv aufweisen. Insbesondere zählen zu diesen auch thermostabile DNA Polymerasen, sowie deren Mutanten.

Unter dem Begriff "Klenow-Fragment" wird ein jedes C-terminale Fragment einer DNA-Polymerase der Familie A verstanden, das sowohl Polymeraseaktivität wie auch 3'→5' Exonukleaseaktivität (aber keine 5'→3' Exonukleaseaktivität) besitzt. Unter "Vektoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Plasmide, Cosmide, Phagemide und Viren zu verstehen, die neben einer DNA von Interesse (wobei es sich insbesondere um erfindungsgemäße Sequenzen von DNA-Polymerasen aus der Familie A handelt) auch Kontrollelemente, die die Expressierung der DNA von Interesse steuern, umfassen.

Unter den Begriff "Wirtszellen" fallen sowohl prokaryontische Zellen, wie *E. coli* (insbesondere *E. coli* XL1 -blue, DH5α, BL21 (DE3), M15 [pREP4], SG13005 [pREP4], BL21 (DE3) pLysS), *Halomonas elongata*, *Caulobacter sp.*, *Halobacte-*

rium halobium usw., als auch eukaryontische Zellen, wie Hefe- und andere Pilzzellen, pflanzliche und tierische Zellen, einschließlich isolierter menschlicher Zellen, die sich in Zellkultur befinden. Des Weiteren werden unter dem Begriff „Wirtszelle“ auch Zellextrakte verstanden, die bei Vorlage einer mRNA diese translatieren können, wie Weizenkeimextrakt (wheat germ extract) als auch Kaninchen-Reticulocytenextrakt (Rabbit reticulocyte extract, (RRL)). Weiterhin werden hier auch *in vitro* Expressionssysteme als „Wirtszelle“ verstanden, wie z. B. das T7 Expression System, pBAD Expression System, ThioFusion™ Expression Systems, trc Expression System, PL Expression System, PurePro™ *Caulobacter* Expression System, Microbiological Media and Media Components, Qiagen pQE Expression System und das Novagen pET Expression System usw.

Ausführungsformen (1) und (2) der Erfindung betreffen DNA-Polymerasen der Familie A oder deren Klenow-Fragment, die sich von natürlich vorkommenden DNA-Polymerasen dadurch unterscheiden, dass sie eine erhöhte Fehlpaarungsdiskriminierung aufweisen, was zu einer erhöhten Selektivität der Enzymaktivität führt. Die erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen leiten sich von bakteriellen DNA-Polymerasen, wie Polymerasen von *E. coli*, *Aquifex*, *Borrelia*, *Bacillus*, *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Chloroflexus*, *Haemophilis*, *Heliobacter*, *Lacococcus*, *Methylobakterium*, *Myocobakterium*, *Rhodothermus*, *Rickettsia*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Syncehocyts*, *Treponema* usw., insbesondere jedoch auch von Polymerasen thermostabiler Organismen wie *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis*, *Rhodothermus obamensis*, *Bacillus stearothermophilus* usw. ab. Bei den erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen gemäß Ausführungsform (1) oder deren Klenow-Fragmenten ist dabei insbesondere in der Motiv-C-Sequenz QVH in Positionen 879 – 881 (in Bezug auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aus *E. coli*) wenigstens ein Aminosäurerest, vorzugsweise das Q und/oder das H, durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt.

In Ausführungsform (2) der Erfindung ist wenigstens der Aminosäurerest Q879 bezogen auf SEQ ID NO:2 durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt. In einem bevorzugten Aspekt der Ausführungsform (2) ist in der Motiv-C-Sequenz QVH weiterhin der Aminosäurerest H881 durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt.

In einem weiteren bevorzugten Aspekt der Ausführungsformen (1) und (2) ist der Aminosäurerest in Position 880 (bezogen auf SEQ ID NO:2) ausgewählt aus Val, Leu, Ile, Ala oder Tyr und besonders bevorzugt ausgewählt aus Val und Ile.

"Lipophile Aminosäurereste" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen die Aminosäurereste Gly, Ala, Val, Leu, Met, Phe, Trp, Ile, Pro usw. Bevorzugte Reste sind dabei Gly, Ala, Val, Leu und Ile. Im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Motiv-C-Sequenz QVH vorzugsweise durch die Sequenzen LVL, LVG, QVL, PIL, QVV, LVA, LAA, LVV, LVI, IVI, III, VVV, QVV, QVA usw. ersetzt, wobei ein Austausch durch LVL und LVG besonders bevorzugt ist.

Neben dem vorstehend genannten Austausch kann die erfindungsgemäße Polymerase noch weitere Mutationen wie z. B. Deletionen, Substitutionen und/oder Additionen (jeweils bis zu 20 Aminosäureresten) aufweisen, vorausgesetzt dass dadurch das größere Verlängerungsverhältnis ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$), bezogen auf den Wildtyp, nicht beeinträchtigt wird. Zu den Substitutionen zählen dabei insbesondere weitere (vorzugsweise konservative) Austausche in der Motiv-C-Sequenz, die neben dem oben aufgeführten Ersetzen wenigstens eines Restes in QVH durch einen lipophilen Aminosäurerest erfolgen. So umfasst die vorliegende Erfindung insbesondere auch solche DNA-Polymerasen, die eine Aminosäuresequenz LVN, LYH, PLQ, LVQ, QDL, QEL, QUV usw. an der Stelle von QVH im C-Motiv enthalten.

Darüber hinaus wurde gefunden, dass auch eine DNA-Polymerase mit der Sequenz QVN anstelle von QVH im C-Motiv ein größeres Verlängerungsverhältnis ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$), bezogen auf den Wildtyp, aufweist.

Weiterhin beinhaltet die Erfindung eine Taq-Polymerase, deren QVH Sequenz wie vorstehend beschrieben ausgetauscht wurde. Besonders bevorzugt sind dabei solche Taq-Polymerasen, deren QVH Sequenz durch LVL oder LVG ausgetauscht wurde (in Bezug auf die in SEQ ID NO:4 gezeigte Taq Polymerase Proteinsequenz sind die Positionen 782-784 vom Austausch betroffen).

Bei den erfindungsgemäßen Klenow-Fragmenten ist es bevorzugt, dass wenigstens zwei Aminosäurereste in QVH durch lipophile Aminosäurereste ersetzt sind.

Besonders bevorzugt unter den vorstehend genannten Sequenzen mit zwei Austausch sind – auch für die Klenow-Fragmente – LVL und LVG.

Die erfindungsgemäßen Polymerase-Mutanten besitzen im Vergleich zu der literaturbekannten Mutante QVA (Minnick, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 3067–3075 (1999)) eine erhöhte Selektivität der Primerverlängerung (Bsp. 7, Fig. 5). Wie Figur 5 zeigt, hat die QVA-Mutante eine wesentlich höhere Neigung als die LVL-Mutante gemäß der vorliegenden Erfindung, Fehlpaarungen zu verlängern.

Die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen wurde somit an einer oder mehreren Stellen verändert im Vergleich zu den DNA-Wildtyppolymerasen, und dies spiegelt sich auch auf Nukleinsäureebene wieder. Erfindungsgegenstand ist auch eine DNA Sequenz, die für eine der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen oder deren Klenow-Fragment codiert (Ausführungsform (3) der Erfindung). Ebenso ist ein Vektor, der die DNA-Polymerase (1) oder (2) codierende DNA Sequenz enthält, sowie eine Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert ist, der die DNA-Polymerase (1) oder (2) codierende DNA Sequenz enthält, und/oder die eine die DNA-Polymerase (1) oder (2) codierende DNA aufweist, Gegenstand der Erfindung. Ebenfalls Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment, welches das Kultivieren der transformierten Wirtszelle und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand umfasst.

Thermostabile DNA-Polymerasen gemäß Ausführungsform (1) oder (2) der Erfindung haben eine höhere Selektivität in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und diskriminieren besser zwischen einzelnen Fehlpaarungen und kanonischen Komplexen als natürlich vorkommende DNA-Polymerasen. Dies bedingt verbesserte Eigenschaften der Mutanten im Einsatz von diagnostischen (Allelspezifische PCR) und molekularbiologischen (DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung) Verfahren. Verfahren, in denen die erfindungsgemäße DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment eingesetzt werden kann, sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die DNA-Polymerase gemäß Ausführungsform (1) oder (2) der Erfindung ist auch in einem Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von

Sequenzvarianten in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe einsetzbar (Ausführungsform (8)). Solch ein Verfahren umfasst vorzugsweise einen oder mehrere der folgenden Schritte:

a) Zugabe von

- Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten,
- einer der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen
- mindestens einem diskriminierenden Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei für jede nachzuweisende Sequenzvariante einer Target-Nukleinsäure ein Primer zugegeben wird, welcher eine Sequenz komplementär zur nachzuweisenden Sequenzvariante aufweist, und wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3'-terminalen-, 3'-proxi-terminalen-, oder 3'-proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest des diskriminierenden Primers ist,
- mindestens einem weiteren Primer, der komplementär ist zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension eines diskriminierenden Primers

b) Durchführung einer Primer-Extensionsreaktion, wobei ein Verlängerungsprodukt des diskriminierenden Primers im Wesentlichen nur dann erhalten wird, wenn die Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält

c) Trennung des Produkts der Primer-Extensionsreaktion von der Template-Nukleinsäure

d) Zyklische Wiederholung der Schritte b) und c) zum Erhalt eines Amplifikationsproduktes, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion

e) Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer Sequenzvariante aufgrund der An- oder Abwesenheit des Amplifikationsproduktes.

In diesem Zusammenhang sind die für die Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Begriffe wie folgt zu verstehen:

Eine "erfindungsgemäße DNA Polymerase" ist dabei eine wie vorstehend definierte DNA-Polymerase der Familie A, die das A-Motiv mit der Sequenz DYSQIELR in ihrem aktiven Zentrum aufweist und bestimmte Mutationen im C-Motiv besitzt. Insbesondere zählen zu diesen auch thermostabile DNA Polymerasen mit Mutationen im C-Motiv. Bei den Mutationen handelt es sich um konser-

vative Substitutionen der QVL Aminosäurereste des C-Motivs und/oder die vorstehend definierten nicht-konservierenden Substitutionen.

Eine "thermostabile DNA Polymerase" ist eine Polymerase, die auch bei Temperaturen von über 42°C funktionsfähig ist, und insbesondere bei auf PCR basierenden Amplifikationsverfahren eingesetzt werden kann.

Insbesondere fallen unter den Begriff „Extensionsreaktionen“ Reaktionsgemische, die wenigstens eine Polymerase, Nukleotide, eine Matrize(n) und Primer umfassen. Die Reaktionsbedingungen sind so gewählt, dass der/die Primer sich an die Matrize anlagern kann/können, und die Polymerase die Verlängerung des/der Primers durch Einbau von matrizenkomplementären Nukleotiden katalysiert. Als Produkt entsteht ein Primerextensionsprodukt.

Eine "Target-Nukleinsäure" ist ein Nukleinsäure-Abschnitt aus einer biologischen Probe, deren Sequenz mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens näher analysiert werden soll. Die biologische Probe besteht dabei in der Regel aus genomischer DNA. Ebenso gut ist das erfindungsgemäße Verfahren jedoch für die Analyse von RNA-Sequenzvarianten geeignet. Es ist dabei unerheblich, ob die Probe aus zellulärem Material oder biologischen Flüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin oder Speichel isoliert wurde.

Unter einer "Sequenzvariante" im Sinne der Erfindung ist eine Target-Nukleinsäure mit einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz zu verstehen, die sich von Sequenzen anderer möglicher Target-Nukleinsäuren nur minimal unterscheidet und bedingt durch diese minimalen Unterschiede identifizierbar ist. Dabei betreffen die Sequenzunterschiede vorzugsweise zwischen ein und drei aufeinander folgende Nukleotidreste. Besonders geeignet ist die vorliegende Erfindung zur Identifikation von Sequenzvarianten betreffend nur einen einzelnen Nukleotidrest (SNP). Dabei kann es sich sowohl um einen Basenaustausch, aber alternativ auch um Nukleotidadditionen bzw. -deletionen handeln. Auf diese Art können verschiedene Allele voneinander unterschieden werden. Punktmutationen oder Polymorphismen können so ebenfalls nachgewiesen werden. Unter einer Sequenzvariante werden somit insbesondere auch Punktmutationen oder Polymorphismen verstanden, die im Hinblick auf prognostische oder diagnostische Fragestellungen analysiert werden.

Bei einer Matrizen-abhängigen Polymerisation von Desoxynukleotid-triphosphaten erfolgt beginnend am 3'-Ende eines sogenannten Primers, welcher an eine

einzelsträngige Template-Nukleinsäure hybridisiert ist, eine Polymerisation der Desoxynukleotidtriphosphate in der Weise, dass eine zur Target-Nukleinsäure komplementäre Sequenz entsteht. Derartige Polymerisationsreaktionen in 5'-3'-Orientierung werden vorzugsweise enzymatisch mit sog. DNA-Polymerasen, wie beispielsweise Klenow-Polymerase, durchgeführt. Besonders bevorzugt sind thermostabile DNA-Polymerasen, wie z.B. Taq-Polymerase (Roche Applied Science Katalog Nr. 1146165).

Ein "diskriminierender Primer" im Sinne der Erfindung ist ein Primer, dessen Sequenz exakt komplementär zu einer bestimmten Sequenzvariante ist, wobei diese Sequenz bestimmte Unterschiede zu einer anderen Sequenzvariante aufweist, welche sich in der zu analysierenden Probe befinden kann. Als "diskriminierender Nukleotidrest" wird in diesem Zusammenhang ein Nukleotidrest verstanden, dessen Komplement in den verschiedenen existierenden Sequenzvarianten von unterschiedlichen Nukleotidresten gebildet wird.

Der "3'-terminale Nukleotidrest" ist derjenige Nukleotidrest, der sich an dem terminalen Ende eines Oligonukleotidprimers befindet, das eine freie 3'-OH-Gruppe besitzt. Der "proxi-terminale Nukleotidrest" ist derjenige Nukleotidrest eines Oligonukleotidprimers, dessen Ende über eine Phosphatgruppe mit dem 5'-Ende des terminalen Nukleotidrestes verbunden ist. Als proxi-proxi-terminaler Nukleotidrest wird derjenige Nukleotidrest bezeichnet, dessen 3'-Ende über eine Phosphatgruppe mit dem 5'-Ende des proxi-terminalen Nukleotidrests verknüpft ist.

Wie aus der oben stehenden Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens hervorgeht, handelt es sich bei den Schritten a)-e) im Wesentlichen um eine Amplifikationsreaktion, die abhängig von der An- oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenzreaktion zu einem Amplifikationsprodukt führt. Derartige Verfahren können deshalb nach aus dem Stand der Technik bekannten Protokollen für PCR-Reaktionen durchgeführt werden.

Gegenstand der Erfindung ist in diesem Zusammenhang auch ein Kit, enthaltend Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein derartiger Kit enthält insbesondere eine erfindungsgemäße DNA-Polymerase. Wahlweise kann ein derartiger Kit zusätzliche Komponenten enthalten wie beispielsweise einen oder mehrere (diskriminierende) Primer, Desoxynukleotidtriphosphat, Puffer, Quantifizierungsreagenzien, insbesondere interkalierende Reagenzien oder in der

kleinen Furche anbindende Reagenzien, wobei besonders bevorzugt Reagenzien aus der Gruppe von PicoGreen (Molecular Probes), SybrGreen (Molecular Probes), Ethidiumbromid, Gelstar (Cambrex), Vista Green (Amersham) ausgewählt werden, Polymerase-blockierende Antikörper, insbesondere TaqBlock, sowie Mittel zur Template-abhängigen Polymerisation der Desoxynukleotidtriphosphate. Die einzelnen Komponenten des Kits können in verschiedenen Ausführungsformen wahlweise in einem Aufbewahrungsgefäß zusammen bzw. in zwei oder mehreren Aufbewahrungsgefäßen getrennt enthalten sein.

Wie aus den weiter unten aufgeführten Beispielen hervorgeht, sind die beobachteten Effekte hinsichtlich der Verbesserung der Spezifität gegenüber aus dem Stand der Technik verfügbaren Verfahren quantitativ eindeutig belegbar (vgl. Bsp. 7, Fig. 5) und führen dazu, dass unter PCR-Amplifikationsbedingungen Extensionsprodukte von Sequenzvarianten-spezifischen Primern in der Tat im Wesentlichen nur dann erhalten werden, wenn die zu analysierende Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält. Dieser spezifische Effekt kann durch Verbesserung und Optimierung der jeweiligen PCR-Parameter mit Hilfe von dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannten Maßnahmen optimiert und an die jeweils nachzuweisende Sequenzvariante adaptiert werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Hilfe von Real Time PCR. Bei dieser Methodik werden die Endprodukte der Amplifikationsreaktion nicht gelelektrophoretisch nachgewiesen, sondern der Verlauf der Amplifikationsreaktion wird mit Hilfe von geeigneten Fluoreszenz-markierten Hybridisierungssonden verfolgt, so dass kinetische Echtzeitmessungen und Quantifizierungen möglich sind.

Bei den für die erfindungsgemäßen Verfahren einzusetzenden Hybridisationssonden handelt es sich in der Regel um einzelsträngige Nukleinsäuren wie einzelsträngige DNA oder RNA bzw. deren Derivate oder alternativ auch PNAs, die bei der Annealing-Temperatur der Amplifikationsreaktion mit der Target-Nukleinsäure hybridisieren. Üblicherweise haben diese Oligonukleotide eine Länge von 20 bis 100 Nukleotiden.

Die Markierung kann abhängig vom genauen Detektionsformat an jeder beliebigen Ribose- oder Phosphatgruppe des Oligonukleotids eingeführt werden. Bevorzugt sind Markierungen am 5'- und 3'-Ende des Nukleinsäuremoleküls. Die Art der Markierung muß im Echtzeit-Modus der Amplifikationsreaktion detektierbar sein. Dies ist beispielsweise nicht nur mit Fluoreszenzmarkierungen möglich, sondern alternativ auch mithilfe von Markierungen, die nach dem Prinzip der NMR detektierbar sind.

Dabei sind viele verschiedene Testführungen möglich. Als besonders geeignet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung haben sich die folgenden drei Detektionsformate erwiesen:

1. FRET-Hybridisationssonden: Für dieses Testformat werden 2 einzelsträngige Hybridisationssonden gleichzeitig verwendet, die komplementär zu benachbarten Stellen desselben Strangs der amplifizierten Target-Nukleinsäure sind. Beide Sonden sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzkomponenten markiert. Bei Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge einer ersten Komponente überträgt diese nach dem Prinzip des Fluoreszenzresonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, so dass bei Bindung beider Hybridisationsproben an benachbarte Positionen des nachzuweisenden Target-Moleküls eine Fluoreszenzemission der zweiten Komponente gemessen werden kann.

Alternativ können ein Fluoreszenz-markierter Primer und nur eine markierte Oligonukleotidsonde verwendet werden (Bernard et al., Analytical Biochemistry 235, 1001-107 (1998)).

2. TaqMan-Hybridisationssonden: Eine einzelsträngige Hybridisationssonde wird mit 2 Komponenten markiert. Bei Anregung der ersten Komponente mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, den sogenannten Quencher übertragen. Während des Annealing-Schrittes der PCR-Reaktion bindet die Hybridisationssonde an die Target-DNA und wird während der sich anschließenden Elongationsphase durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase degradiert. Dadurch werden die angeregte Fluoreszenzkomponente und der Quencher räumlich voneinander getrennt, so dass eine Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann.

3. Molecular Beacons: Diese Hybridisationssonden sind ebenfalls mit einer ersten Komponente und einem Quencher markiert, wobei sich die Markierungen vorzugsweise an den beiden Enden der Sonde befinden. In Lösung befinden sich beide Komponenten aufgrund der Sekundärstruktur der Sonde in räumlicher Nähe zueinander. Nach Hybridisierung an die Target-Nukleinsäure werden beide Komponenten von einander getrennt, so dass nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge die Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann (Lizardi et al., US 5,118,801).

In alternativen Ausführungsformen kann das jeweilige Amplifikationsprodukt erfindungsgemäß auch durch einen DNA-Bindefarbstoff nachgewiesen werden, welcher bei Interaktion mit doppelsträngiger Nukleinsäure nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge ein entsprechendes Fluoreszenzsignal emittiert. Als besonders geeignet für diese Anwendung haben sich die Farbstoffe SybrGreen und SybrGold (Molecular Probes) erwiesen. Alternativ können auch interkalierende Farbstoffe verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und Abbildungen näher erläutert. Die beschriebenen Verfahren sind nicht als Einschränkung der Erfindung sondern als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beispiele

Beispiel 1: Aufbau einer Bibliothek und Reinigung von Klenow-Fragment-Varianten

Das Plasmid pQKF⁺ (Brakman, S., Nieckchen, P., ChemBioChem 2001, 2, 773-7; siehe auch das in SEQ ID NO:26 gezeigte äquivalente Plasmid pQE30) ermöglicht die Expression des N-terminalen 6-His-markierten Klenow-Fragments von *E. coli*-DNA-Polymerase I (3'-5'exo⁻) unter der Kontrolle einer T5-Promotor/Doppel-lac-Operator-Sequenz. Die Einführung von Mutationen in die Motiv-C-Sequenz, die für Q879, V880 und H881 codiert, erfolgte durch eine zweistufige Megaprimer-Mutagenese. PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von PfuTurbo-DNA-Polymerase (Stratagene) und unter Standardbedingungen durchgeführt. Die erste PCR wurde mit einer dotierten Primerbibliothek durchgeführt (5'-GTA CGT ATG ATC ATG NNN NNN NNN GAT GAA CTG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:5), die so aufgebaut war, dass sie 40% Nichtwildtyp-Nucleotide auf jeder der neun Zielpositionen und einen 23mer-Downstream-Primer (5'-GCT AAT TAA GCT TGG

CTG CAG GC-3'; SEQ ID NO:6) enthielt, was ein 195mer-PCR-Produkt ergab. Die zweite PCR wurde unter Verwendung des Agarose-Gel-gereinigten 195mers und eines 24mer-Antisense-Primers (5'-TAC ATG GAC CTT TAC TTC GAA CGC-3' SEQ ID NO:7) durchgeführt und ergab ein 457-bp-Produkt, das mit Csp45I und HindIII verdaut und in pQKF⁻ einkloniert wurde. Die resultierende Plasmidbibliothek wurde in *E.-coli*-XL-1blue (Stratagene) transformiert, Klone wurden aus Agarplatten herausgesucht und getrennt über Nacht in 96-Napf-Platten gezüchtet, die Superbroth-Medium (100 µg/ml Ampicillin) enthielten. Klenow-Fragment-Varianten wurden parallel in 600-µl-Kulturen exprimiert, geerntet und lysiert, wobei man 96-Napf-Platten verwendete, wie es beschrieben ist. Die erhaltenen 300-µl-Lysate wurden mit 900 µl Aufbewahrungspuffer (50mM Tris-HCl pH 7,3, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Aprotinin) verdünnt, zentrifugiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für Primerverlängerungsreaktionen und kinetische Messungen im stationären Zustand wurden Klenow-Fragment und ausgesuchte Mutanten exprimiert, wie es oben beschrieben ist, und unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gereinigt, wobei die Vorschriften des Herstellers befolgt wurden, aber das Imidazol im Lyse- und Waschschrift weggelassen wurde. Die erhaltenen Enzyme waren >95% rein, was durch SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung bestätigt wurde. Nach Austausch des Puffers (gegen 100 mM K₂HPO₄, 1 mM DTT pH 6,5 mit 50% Glycerin) wurden Konzentrationen unter Verwendung des Nanoorange-Assays (Molecular Probes) gemessen und auf 1 µg/µl eingestellt.

Beispiel 2: Durchmusterung (Screening)

Die Reaktionsgemische für die Durchmusterung der Bibliothek enthielten 150 nM Matrize, 225 nM Primer, 50 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,05% Triton[®] X-100 und jeweils 200 µM dNTP. Die Reaktionen umfassten den 20mer-Primer FVL20TH (5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3'; SEQ ID NO:8), der so gestaltet ist, dass er mit der 3'-terminalen Base an das humane SNP G1691A bindet, das an der Faktor-V-Leiden-Mutation beteiligt ist. Für Messungen von Paarungsverlängerungseffizienzen wurde die 90mer-Matrize TFVL90A (5'-GAC ATC ATG AGA GAC ATC GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC TGT AAG AGC AGA TCC CTG GAC AGG CAA GGA ATA CAG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:9), die für das mutante Allel 1691A des humanen Faktor-V-ORF codiert, verwendet, was zu einem TA-Basenpaar am 3'-Terminus des Primers führte. Um

Zugang zu Aktivitäten von Klenow-Varianten zu erhalten, die einen fehlgepaarten Primerterminus prozessieren, wurde die 90mer-Matrize TFVL90G (5'-GAC ATC ATG AGA GAC ATC GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC TGT AAG AGC AGA TCC CTG GAC AGG CGA GGA ATA CAG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:10) verwendet, die für das entsprechende Wildtyp-Allel 1691G codiert, was zu einer TG-Fehlpaarung am 3'-Primerterminus führte. Beide Reaktionen wurden für jedes Element der Bibliothek parallel durchgeführt, um eine Bewertung der Aktivitätsverhältnisse als Verlängerungsselektivitäten zu ermöglichen. 10 µl der Reaktionsgemische wurden in schwarze 384-Napf-Platten ausgegeben, die auf 37 °C vorgewärmt wurden, wobei man eine automatische Flüssigkeitshandhabungsvorrichtung (Hamilton Microlab Star) verwendete, und anschließend wurden 5 µl Ly-satlösung hinzugefügt. Nach 10 min wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Stopplösung (50 mM Tris-HCl pH 7,3, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) abgebrochen, die 3,4x SYBRGrün I (Molecular Probes) für die Quantifizierung der von Klenow-Varianten erzeugten dsDNA enthielt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzplatten-Lesegeräts (Polarstar Optima, BMG Labtechnologies GmbH) mit Anregung bei 485 nm und Emission bei 520 nm quantifiziert. Die Verhältnisse der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$, willkürliche Einheiten) wurden zur Bestimmung der Verlängerungsselektivität herangezogen. Alle DNA-Polymerasen mit größerem Verlängerungsselektivitätsverhältnis ($F_{\text{match}}/F_{\text{mismatch}}$) als der Wildtyp wurden als Enzyme identifiziert, die eine erhöhte Verlängerungsselektivität besitzen.

Beispiel 3: Primerverlängerungsassays

Primer-Matrizensubstrate wurden assoziiert, indem man 5'-³²P-markierten Primer im spezifischen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,05% Triton® X-100) mit der doppelten Menge Matrize mischte. Das Gemisch wurde 5 min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend über 1 h auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Nach der Assoziation wurden dNTP hinzugefügt, und die Lösung wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. 15 µl Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enzymlösung in 1x Reaktionspuffer zu 10 µl Assoziationsmischung eingeleitet, und es wurde 10 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Assays beinhalten 150 nM Primer, 225 nM Matrize, jeweils 1 mM dNTP und 590 nM Enzym in geeignetem Reaktionspuffer. Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Gelbeladungspuffer (80% Formamid,

EDTA, 20 mM) abgebrochen, und die Produktgemische wurden durch 14% denaturierendes PAGE analysiert (siehe Fig. 1 und 2). Die folgenden Primer- und Matrizensequenzen wurden im Zusammenhang mit verschiedenen SNPs (Positionen unterstrichen) eingesetzt:

Humane genomische Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz: Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3' (SEQ ID NO:11), Wildtypmatrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC GAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12), mutante Matrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC AAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12).

Humane somatische BRAF-T1796A-Mutation: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:13), Wildtypmatrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GTG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3' (SEQ ID NO:14), mutante Matrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GAG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3' (SEQ ID NO:14).

Humane Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15), Wildtypmatrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CGT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3' (SEQ ID NO:16), mutante Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CAT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3' (SEQ ID NO:16).

Humane saure Ceramidase-Mutation A107G: Primer: 5'-CGT TGG TCC TGA AGG AGG AT-3' (SEQ ID NO:17), Wildtypmatrize: 5'-AAA TCA ACC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3' (SEQ ID NO:18), mutante Matrize: 5'-AAA TCA ACC TGT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3' (SEQ ID NO:18).

Getestet wurden so die Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-Exonuklease-defizient) mit LVL und LVG in Positionen 879-881 (bezogen auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment aus *E. coli*) im Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym mit QVH in Positionen 879-881 (Fig. 1 und 2).

Beispiel 4: Klonieren von Taq-DNA-Polymerase

Das Plasmid pTTQ18::*Taq* (SEQ ID NO: 25) wurde von Engelke *et al.* (Anal. Biochem. 1990, 191, 396-400 (1990)) konstruiert und ermöglicht die Expression von *Taq*-DNA-Polymerase unter der Kontrolle einer *Ptac*-Promotor/*lac*-Operator-Sequenz. Die LVL-Mutation wurde durch PCR in das *Taq*-QVH-Motiv eingeführt, wobei man den QuikChange®-Kit von *Stratagene* verwendete. Das resultierende mutante Plasmid und das Wildtypplasmid wurden in *E.-coli*-XL1-Blue (*Stratagene*) transformiert. Klone wurden herausgesucht und über Nacht in 20 ml Superbroth (100 µg/ml Carbenicillin) gezüchtet. Die Expression der *Taq*-Klone

wurde in Kulturen in 1 l Superbroth (100 µg/ml Carbenicillin) durchgeführt, und die Zellen wurden nach 16 h Induktion mit 1 mM IPTG geerntet. Die Reinigung der *Taq*-DNA-Polymerase wurde so durchgeführt, wie es von Engelke *et. al* (Anal. Biochem. 1990, 191, 396-400) beschrieben wird. Anstelle der Reinigung durch Ionenaustausch wurde eine Gelfiltration unter Verwendung einer Säule mit Sephadex®-75 (Amersham) angewendet. Die erhaltenen Enzyme waren zu >90% rein, was durch SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung bestätigt wurde. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung des Nanorange-Assays (Molecular Probes) und SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung gemessen.

Beispiel 5: Primerverlängerung mit Katalyse durch *Taq*-DNA-Polymerase

Primer-Matrizensubstrate wurden assoziiert, indem man 5'-³²P-markierten Primer im spezifischen Reaktionspuffer (50 mM Tris -HCl (pH 9,2 bei 25 °C), 16 mM Ammoniumsulfat und 2,5 mM MgCl₂, 0,1 % Tween® 20) mit der doppelten Menge Matrize mischte. Das Gemisch wurde 10 min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend über 1 h auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Nach der Assoziation wurden dNTP hinzugefügt, und die Lösung wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. 15 µl Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enzymlösung in 1x Reaktionspuffer zu 10 µl Assoziationsmischung eingeleitet, und es wurde 10 min lang bei 72 °C inkubiert. Die Assays beinhalten 150 nM Primer, 225 nM Matrize, jeweils 1 mM dNTP und 0,5 ng *Taq*-LVL-DNA-Polymerase (mutante Polymerase) und 0,06 ng *Taq*-DNA-Polymerase in geeignetem Reaktionspuffer. Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Gelbeladungspuffer (80% Formamid, EDTA, 20 mM) abgebrochen, und die Produktgemische wurden durch 14% denaturierendes PAGE analysiert (siehe Figur 3). Bezüglich der Primer- und Matrizensequenzen, die im Zusammenhang mit den SNPs humane genomische Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz, humane somatische BRAF-T1796A-Mutation und humane Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A verwendet wurden, wird auf Beispiel 3 verwiesen.

Beispiel 6: Echtzeit-PCR-Experimente

Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung eines *iCycler*-Systems (BIORAD) durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, das 4 pM der jeweiligen Matrizen in *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9,2 bei 25 °C), 16 mM Ammoniumsulfat und 2,5 mM MgCl₂, 0,1%

Tween® 20 enthielt. Die endgültigen Gemische enthielten dNTPs (jeweils 200 µM dATP, dGTP, dCTP und TTP), Primer (jeweils 0,5 µM der jeweiligen Primersonde und des umgekehrten Primers) und 13 ng *Taq*-DNA-Polymerase (SEQ ID NO:4), 95 ng DNA-Polymerase von *Taq*-LVL-Mutante (SEQ ID NO:4 mit LVL in Positionen 782 – 784) und eine wässrige 1/50.000-Verdünnung einer 10.000fachen Lösung von *SybrGreen I* in DMSO (*Molecular Probes*). Alle PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt: Anfangsdenaturierung bei 95 °C während 3 min, dann 40 Zyklen Denaturierung bei 95 °C während 30 s, Primerassoziation bei 55 °C während 35 s und Verlängerung bei 72 °C während 40 s. Die vorgestellten Ergebnisse stammen von wenigstens dreimal wiederholten unabhängigen Messungen an drei Parallelansätzen, die aus einer Stammmischung hervorgingen. Die Ergebnisse sind in Figur 4 zusammengefasst. Die folgenden DNA-Sequenzen wurden eingesetzt:

Sequenzen im BRAF-Zusammenhang: Primersonde BraFT: 5'-d(GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T) (SEQ ID NO:19), umgekehrter Primer: 5'-d(AGA GGA AAG ATG AAG TAC TAT G) (SEQ ID NO:20), Zielmatrize BraFX: 5'-d(CAA CTG TTC AAA CTG ATG GGA CCC ACT CCA TCG AGA TTT CXC TGT AGC TAG ACC AAA ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TTC ATG AAG AAA TAT ATC TGA GGT GTA GTA AGT AAA GGA AAA CAG TAG ATC TCA TTT TCC TAT CAG AGC AAG CAT TAT GAA GAG TTT AGG TAA GAG ATC TAA TTT CTA TAA TTC TGT AAT ATA ATA TTC TTT AAA ACA TAG TAC TTC ATC TTT CCT CT), X= A BraFA, X= T, BraFT (SEQ ID NO:21). Sequenzen im DPyD-Zusammenhang: Primersonde DpyDT: 5'-d(GTT TTA GAT GT TAA ATC ACA CTT AT) (SEQ ID NO:22), umgekehrter Primer: (5'-d(AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AG) (SEQ ID NO:23), Zielmatrize DPyDX: 5'-d(AAA ATG TGA GAA GGG ACC TCA TAA AAT ATG TCA TAT GGA AAT GAG CAG ATA ATA AAG ATT ATA GCT TTT CTT TGT CAA AAG GAG ACT CAA TAT CTT TAC TCT TTC ATC AGG ACA TTG TGA CAA ATG TTT CCC CCA GAA TCA TCC GGG GAA CCA CCT CTG GCC CCA TGT ATG GCC CTG GAC AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AGC TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT ATT GGT GTC AAA GTG TCA CTG AAC TAA AGG CTG ACT TTC CAG ACA ACX TAA GTG TGA TTT AAC ATC TAA AAC), X= A DpyDA, X= T, DpyDG (SEQ ID NO:24). Die Oligonucleotide BraFX und DpyDX (SEQ ID NO:21 und 24) wurden von IBA, Göttingen, synthetisiert und gereinigt.

Beispiel 7 (Vergleichsbeispiel): Vergleich der Fehlpaarungsdiskriminierung

Verglichen wurden eine erfindungsgemäße und eine literaturbekannte Mutante der *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (SEQ ID NO:2) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Es handelte sich hierbei um die LVL-Mutante (SEQ ID NO:2 mit LVL in Positionen 879-881) und die QVA-Mutante, welche dem Klenow-Fragment mit H881A aus Minnick, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 3067-3075 (1999) entspricht (SEQ ID NO:2 mit HVA in Positionen 879-881).

Mit den beiden genannten Mutanten wurden Primerverlängerungsassays gemäß Beispiel 3 durchgeführt. Getestet wurden die Fehlpaarungsdiskriminierung mit der humanen genomischen Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz: Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3' (SEQ ID NO:11), Wildtypmatrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC GAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12), mutante Matrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC AAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12). Verglichen wurde die Neigung der beiden Mutanten, Fehlpaarungen im Vergleich zu kanonischen Komplexen zu verlängern. Wie Figur 5 zeigt, hat die QVA-Mutante eine wesentlich höhere Neigung als die LVL-Mutante, Fehlpaarungen zu verlängern.

Patentansprüche

1. Eine DNA-Polymerase der Familie A, die eine modifizierte Motiv-C-Sequenz und eine, im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyppolymerase, erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweist oder ein Klenow-Fragment derselben, wobei in der Motiv-C-Sequenz QVH in Position 879-881, bezogen auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase, wenigstens der Aminosäurerest Q879 durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt ist.
2. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 1, die eine bakterielle DNA-Polymerase, vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase ist, besonders bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe von Polymerasen von *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis*, *Rhodothermus obamensis* oder *Bacillus stearothermophilus*.
3. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 1 oder 2, wobei in der Motiv-C-Sequenz QVH in Position 879-881
 - (i) weiterhin H881 durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt ist, und/oder
 - (ii) der Aminosäurerest in Position 880 Val, Leu, Ile, Ala oder Tyr, insbesondere Val oder Ile ist.
4. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei der lipophile Aminosäurerest ausgewählt ist aus Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met und Trp, vorzugsweise ausgewählt ist aus Gly, Ala, Val, Leu und Ile und besonders bevorzugt die Motiv-C-Sequenz QVH ersetzt ist durch die Sequenzen LVL oder LVG.
5. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4,
 - (i) die eine Taq-Polymerase mit der in SEQ ID NO:4 gezeigten Sequenz ist, in der die Sequenz QVH in Position 782-784 durch LVL oder LVG ersetzt ist oder

- (ii) die ein Klenow-Fragment mit der in SEQ ID NO:2 gezeigten Sequenz ist, in der die Sequenz QVH in Position 879-881 durch LVL oder LVG ersetzt ist.
6. Eine DNA-Sequenz, die für eine DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 codiert.
 7. Ein Vektor, der die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 6 enthält.
 8. Eine Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Anspruch 7 transformiert ist und/oder eine DNA gemäß Anspruch 6 aufweist.
 9. Ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß Anspruch 8 und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand.
 10. Verwendung der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 in diagnostischen und molekularbiologischen Verfahren, einschließlich allel-spezifischer PCR, DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung usw.
 11. Ein Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe, umfassend die Verwendung einer DNA-Polymerase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5.
 12. Verfahren gemäß Anspruch 11, enthaltend folgende Schritte:
 - a) Zugabe von
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten,
 - einer DNA-Polymerase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5,
 - mindestens einem diskriminierenden Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei für jede nachzuwei-

- sende Sequenzvariante einer Target-Nukleinsäure ein Primer zugegeben wird, welcher eine Sequenz komplementär zur nachzuweisenden Sequenzvariante aufweist, und wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3'-terminalen-, 3'-proxi-terminalen-, oder 3'-proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest des diskriminierenden Primers ist,
- mindestens einem weiteren Primer, der komplementär ist zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension eines diskriminierenden Primers;
 - b) Durchführung einer Primer-Extensionsreaktion, wobei ein Verlängerungsprodukt des diskriminierenden Primers im Wesentlichen nur dann erhalten wird, wenn die Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält;
 - c) Trennung der Produkts der Primer-Extensionsreaktion von der Template-Nukleinsäure;
 - d) Zyklische Wiederholung der Schritte b) und c) zum Erhalt eines Amplifikationsproduktes, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion; und
 - e) Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer Sequenzvariante aufgrund der An- oder Abwesenheit des Amplifikationsproduktes.
13. Das Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Schritte b) - e) als Real Time PCR oder Real Time RT-PCR durchgeführt werden.
14. Ein Kit zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe gemäß Anspruch 11 bis 13, enthaltend wenigstens eine DNA-Polymerase gemäß Ansprüchen 1 bis 5.
15. Der Kit nach Anspruch 14, zusätzlich enthaltend einen oder mehrere der folgenden Komponenten:
- einen oder mehrere diskriminierende Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu min-

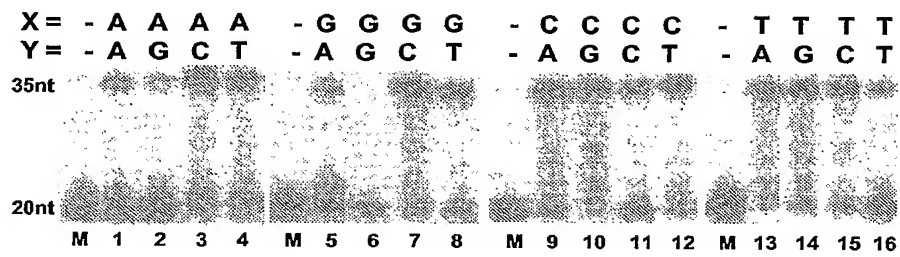
destens einem 3'-terminalen-, 3'-proxi-terminalen-, oder 3'-proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest der diskriminierenden Primer ist,

- einen oder mehrere weitere Primer, die komplementär sind zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension der diskriminierenden Primer,
- Desoxy-Nukleosid-Triphosphate,
- Puffer
- Quantifizierungsreagenzien, insbesondere interkalierende Reagenzien oder in der kleinen Furche anbindende Reagenzien und
- Polymerase-blockierende Antikörper, insbesondere TaqBlock.

-1/5-

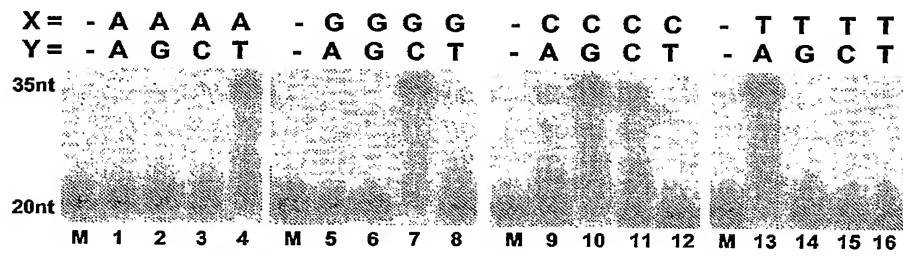
a

Wildtyp (QVH):



b

LVG:



c

LVL:

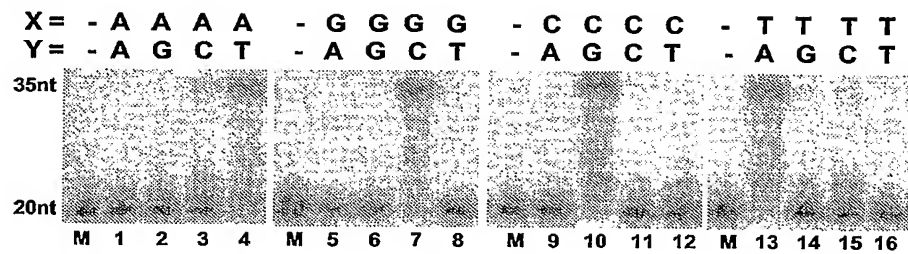


Fig.1

-2/5-

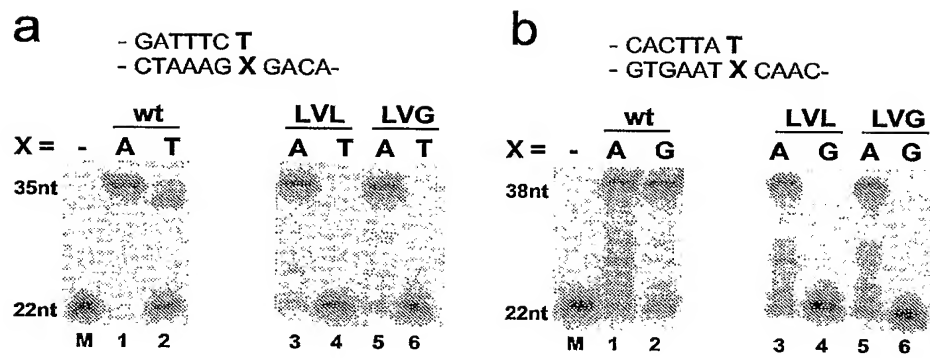
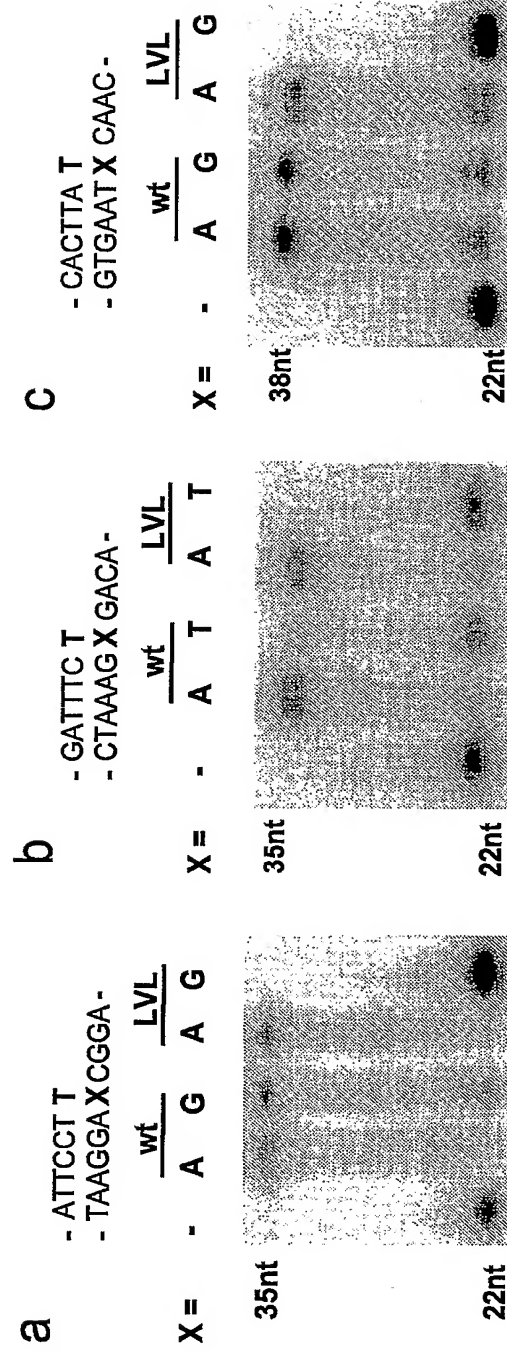


Fig.2

-3/5-



-4/5-

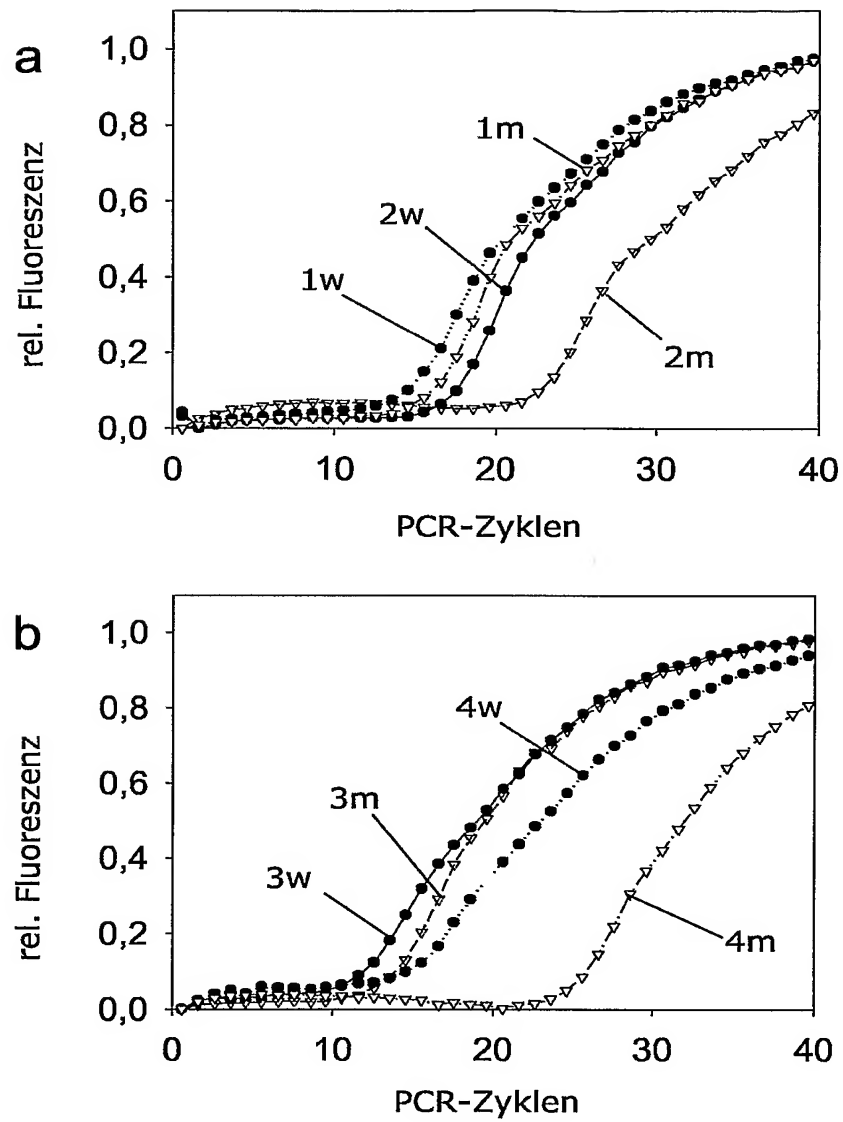


Fig.4

-5/5-

-- TTCCT T
-- AAGGA X CGGAC--

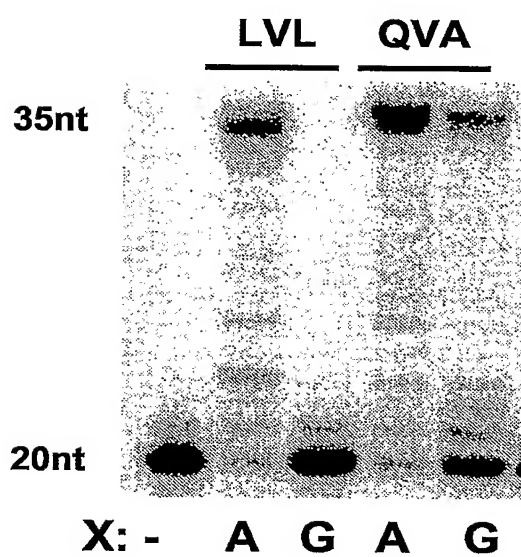


Fig.5